

Studies on tumor necrosis factor : endogenous mediators of sepsis and cachexia

Citation for published version (APA):

Debets, J. M. H. (1989). *Studies on tumor necrosis factor : endogenous mediators of sepsis and cachexia*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19890622jd>

Document status and date:

Published: 01/01/1989

DOI:

[10.26481/dis.19890622jd](https://doi.org/10.26481/dis.19890622jd)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Tumor necrosis factor (TNF)/cachectin is a cytokine released by immunocompetent cells involved in inflammatory processes. Numerous studies indicate that it is a major acute phase reactant involved in the host response to infection and trauma. TNF exerts widespread effects on many different cell types and tissues, influencing inflammatory, hemostatic, hormonal and metabolic processes. TNF also possesses strong cytotoxic and antiviral properties, thus probably constituting an important effector cytokine in the host response against viral and malignant disease. Besides its physiological role TNF is considered to be involved in the pathogenesis of several disease states like sepsis, and cachexia accompanying infectious and malignant diseases.

In this thesis both *in vitro* and *in vivo* studies on the cytokine tumor necrosis factor are presented. The results from *in vitro* experiments, studying various aspects of the regulation of production and secretion of TNF by human monocytes, are presented in chapters 2 to 5. Chapters 6 and 7 contain results from *in vivo* studies on the role of circulating TNF in two different patient populations.

In chapter 2 experiments are described which demonstrate that T cell mitogens induce TNF production by peripheral blood mononuclear cells in a T cell-dependent manner. Although it has been demonstrated by other investigators that activated T lymphocytes are capable of producing TNF, TNF is shown to be produced predominantly by monocytes under the experimental conditions of our study. In this study it is also demonstrated that the T cell lymphokine interferon- γ (IFN- γ) is an important humoral mediator of this T cell-dependent pathway of TNF production by monocytes, being capable of inducing TNF secretion by monocytes in endotoxin-free circumstances. This finding confirms data from murine experiments, in which it was demonstrated that IFN- γ enhances macrophage TNF synthesis at a transcriptional level. However, in contrast with our findings with human monocytes, secretion of TNF protein by murine macrophages is dependent on the presence of endotoxin. The findings of this study implicate that, in man, TNF production will not only occur during immune responses against infectious diseases, but also during aseptic immune and inflammatory processes accompanied by activation of the T lymphocyte system.

In chapter 3 it is demonstrated that cross-linking of the receptors for the Fc domain of IgG (Fc γ R) strongly stimulates TNF secretion by human monocytes. The Fc γ R plays an important role in the interaction between the humoral and cellular immune systems, being involved in the mediation of phagocytosis, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), induction of secretion of inflammatory mediators by immune cells, and clearance of potentially harmful immune complexes. Our finding that TNF

secretion by monocytes is strongly stimulated by Fc γ R cross-linking has several implications as to the role of TNF in these immune processes. First, TNF is considered to be an important mediator of monocyte/macrophage cytotoxicity. Our finding that monocyte TNF secretion is induced by Fc γ R-ligand interactions makes it conceivable that TNF is an important effector molecule of monocyte/macrophage ADCC. Since TNF has been shown to possess antiviral and antiparasitic properties, these findings also suggest its involvement in phagocytic processes during viral and parasitic infections. Finally, TNF has been shown to exert detrimental effects on various normal cells and tissues. It might thus be involved in the pathogenesis of tissue destruction occurring in the course of immune complex diseases like rheumatoid arthritis and (antibody-mediated) autoimmune diseases like type I diabetes mellitus.

The role of the two constitutively expressed monocyte Fc γ R in the regulation of TNF secretion has been studied more elaborately in chapter 4. It is demonstrated that on freshly isolated, untreated monocytes, only cross-linking of the 72 kDa, high-affinity Fc γ R, Fc γ RI, triggers TNF secretion, whereas cross-linking of a second class of Fc γ R, the 40 kDa Fc γ RII, does not lead to TNF secretion. However, after treatment of monocytes with proteolytic enzymes or with the desialylating enzyme neuraminidase, Fc γ RII gains capacity to induce TNF secretion. It is demonstrated that the capacity of Fc γ RII to induce TNF secretion after enzyme treatment of monocytes is related to an increase in affinity of this receptor for Fc ligand. Moreover, Fc γ R-mediated TNF secretion is shown to be dependent on Fc-Fc γ R interactions, TNF secretion being absent when Fc γ R are cross-linked with anti-Fc γ R monoclonal antibodies, which interact with Fc γ R via their antigen-binding site. This study suggests a differential role of both Fc γ R in the regulation of TNF secretion by monocytes. Furthermore, the findings of this study make it conceivable that TNF secretion is limited to areas of active inflammation, thus protecting non-inflamed areas against its potential harmful effects.

In chapter 5 we have studied the effect of corticosteroids, which have strong immunosuppressive and antiinflammatory properties, on monocyte TNF secretion induced by four different stimulating agents. Corticosteroids inhibit, as has also been shown for various other inflammatory mediators, TNF secretion. The degree of inhibition is, however, dependent on the type of stimulus used to induce TNF secretion. TNF secretion induced by endotoxin and through Fc γ R cross-linking is shown to be strongly inhibited, whereas TNF secretion following protein kinase C activation is only poorly inhibited. Inhibition of silica-induced TNF secretion is intermediate in comparison with LPS/Fc γ R-induced and PMA-induced TNF secretion. Furthermore, sustained inhibition of TNF secretion requires the continual presence of corticosteroids, inhibition being reversible after removal of corticosteroids from the cultures. These findings explain yet another mechanism by which corticosteroids exert their immunosuppressive and antiinflammatory effects. Since TNF is considered to be a key mediator of endotoxic shock and sepsis, this finding offers a possible explanation for the protective effect of corticosteroids observed in experimental sepsis studies in animal models. This study also clarifies one of the mechanisms underlying the therapeutic efficacy of corticosteroids in immune complex diseases like rheumatoid arthritis, in which TNF is believed to be pathogenetically involved.

In chapter 6 it is demonstrated that treatment of kidney allograft rejection with antithymocyte globulin (ATG) is accompanied by a sudden, short-lived, rise in circulating TNF levels. Moreover, side effects observed during this treatment are shown to occur concurrently with elevated plasma TNF levels, which suggests that TNF is involved in the causation of these symptoms. This conclusion is substantiated by findings of phase I clinical trials with recombinant TNF as an anticancer drug. Side effects observed during administration of rTNF to humans are remarkably similar to those we observed in our patients treated with ATG. It seems clear from this study that under non-septic circumstances raised plasma TNF levels are by themselves not sufficient to cause lethal shock and widespread organ damage, as has been suggested by findings from animal experiments. In vitro studies indicate that TNF release induced by ATG is not due to lysis or activation of T lymphocytes. Possibly, TNF is secreted by monocytes/macrophages upon opsonization of ATG-coated T lymphocytes via a Fc receptor-mediated process, as has been described in chapter 3.

Finally, in chapter 7 it is demonstrated that in septic patients circulating TNF can be detected in one of four patients. It is shown that in septic patients with circulating TNF at the time of sepsis, mortality is twice the mortality of patients without circulating TNF. The difference in mortality between patients with or without circulating TNF seemed not to be caused by differences in degree of sepsis or extent of multiple organ failure, since parameters used to estimate the severity of sepsis and multiple organ failure did not differ significantly between both patient groups. Numerous experimental animal studies have implicated TNF as a crucial endogenous mediator involved in the pathogenesis of sepsis and septic shock. Two clinical studies have demonstrated a relation between the presence of circulating TNF and mortality during meningococcal sepsis. Our study corroborates these findings and extends them to patients suffering from a broad range of diseases underlying the septic state.

SAMENVATTING

Het immuunsysteem van de mens heeft als doel het menselijk organisme te beschermen tegen infecties met pathogene micro-organismen, zoals bacteriën, virussen, parasieten en schimmels. Daarnaast speelt het immuunsysteem een belangrijke rol bij het voorkomen van het ontstaan van kwaadaardige gezwellen. Het goed functioneren van het immuunsysteem vereist een complexe samenwerking tussen vele verschillende soorten cellen, zowel van hematopoietische als niet-hematopoietische oorsprong. Voor de onderlinge communicatie maken deze cellen gebruik van cytokines. Dit zijn moleculen, veelal proteïnen, die door immuuncompetente cellen gesecreteerd worden tijdens immuun- en ontstekingsprocessen. Deze cytokines kunnen een regulerend effect uitoefenen op dezelfde cellen waardoor ze geproduceerd zijn (autocriene beïnvloeding), op andere cellen in de onmiddellijke omgeving (paracriene beïnvloeding), of op cellen elders in het lichaam (endocriene beïnvloeding).

Tumor necrosis factor (TNF), ook wel cachectin genaamd, is een van deze cytokines. TNF is een 17 kDa eiwit, dat in de mens voornamelijk wordt geproduceerd door mononucleaire leukocyten, i.e. monocyten, macrofagen, en lymfocyten. TNF productie door monocyten en macrofagen wordt zeer krachtig gestimuleerd door het lipopolysaccharide (LPS) van gram-negatieve bacteriën (endotoxine). TNF heeft een groot aantal immunoregulatorische en inflammatoire eigenschappen en vormt een belangrijke endogene mediator betrokken bij de acute fase respons tijdens infecties en bij trauma. TNF bezit tevens cytotoxische en antivirale eigenschappen en vormt daardoor een belangrijk effector proteïne van de immuunrespons tegen maligniteiten en virale infecties. Naast een fysiologische rol zijn er aanwijzingen dat TNF ook betrokken is bij de pathogenese van verschillende ziekteprocessen, met name bij sepsis en septische shock, en bij cachexie optredend tijdens infecties of maligniteiten.

In dit proefschrift worden in vitro en in vivo studies van het cytokine TNF beschreven. Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding en een overzicht van de literatuur met betrekking tot de fysiologische en pathofysiologische betekenis van TNF. Hoofdstuk 2 geeft een inleiding tot en bespreking van het experimentele werk beschreven in dit proefschrift. In vitro studies, die verschillende aspecten van de regulatie van TNF productie en secretie door humane monocyten als onderwerp hebben, worden beschreven in hoofdstuk 3 tot en met 6. Hoofdstuk 7 en 8 bevatten studies naar de in vivo rol van circulerend TNF bij twee verschillende patiëntenpopulaties.

In hoofdstuk 3 worden experimenten beschreven die aantonen dat T cel mitogenen op een T cel-afhankelijke wijze TNF secretie door mononucleaire cellen induceren. Hoewel andere onderzoekers hebben aangetoond dat geactiveerde T lymfocyten TNF

kunnen produceren, wordt TNF onder de experimentele condities van onze studie voornamelijk geproduceerd door monocyten. In deze studie wordt ook aangetoond dat het door T-lymfocyten geproduceerde cytokine interferon- γ (IFN- γ) een belangrijke humorale mediator is van deze T-cel-afhankelijke TNF-productie door monocyten. IFN- γ induceert dosis-afhankelijk TNF-secretie door monocyten. Deze bevinding bevestigt de resultaten van andere onderzoekers, die in muizestudies aantoonde dat IFN- γ TNF-productie door macrofagen op transcriptieniveau verhoogt. In tegenstelling echter tot deze studies, waarin TNF-secretie alleen maar plaatsvindt in de aanwezigheid van endotoxine, wordt in onze studie TNF-secretie door monocyten ook geïnduceerd door IFN- γ in de afwezigheid van endotoxine. De bevindingen van onze studie impliceren dat in de mens TNF-productie en -secretie niet alleen tijdens infectieuze ziektes zal optreden, maar ook tijdens niet-infectieuze immuun- en ontstekingsprocessen waarbij het T-cel-systeem wordt geactiveerd (bv. transplantaat-rejecties, auto-immuunziektes etc.).

In hoofdstuk 4 wordt aangetoond dat cross-linking van de receptor voor de Fc staart van IgG (Fc γ receptor) TNF-secretie door monocyten induceert. Fc γ receptoren spelen een belangrijke rol bij de interactie tussen het humorale en het cellulaire immuunsysteem. Fc γ receptoren zijn van belang voor verschillende immuunprocessen, zoals fagocytose, antilichaam-afhankelijke cellulaire cytotoxiciteit (ADCC), de inductie van secretie van ontstekingsmediatoren door immuuncompetente cellen, en de klaring van potentieel schadelijke immuuncomplexen. Onze bevinding dat TNF-secretie door monocyten in sterke mate gestimuleerd wordt door cross-linking van Fc γ receptoren, heeft verschillende implicaties met betrekking tot de rol die TNF in deze immuunprocessen speelt. TNF wordt beschouwd als een mediator van de cytotoxische activiteit van monocyten en macrofagen, bijvoorbeeld gericht tegen tumorcellen. TNF vormt waarschijnlijk een belangrijk effector molecuul in de afweer tegen maligne processen. Fc γ receptor-geïnduceerde TNF-secretie vormt een mogelijke verklaring van het mechanisme van TNF-productie tijdens ADCC gericht tegen maligne cellen. Daarnaast bezit TNF antivirale en antiparasitaire eigenschappen. Tijdens een humorale immuunrespons tegen viraal geïnfecteerde cellen of tegen parasieten zal TNF-secretie worden geïnduceerd via cross-linking van Fc γ receptoren op monocyten/macrofagen betrokken bij de immuunrespons. TNF-secretie door monocyten blijkt ook zeer krachtig geïnduceerd te worden door immuuncomplexen. Deze bevinding is relevant voor de pathofysiologische rol van TNF in immuuncomplexziektes zoals rheumatoïde artritis. Op monocyten komen twee verschillende Fc γ receptoren tot expressie, een 72 kDa receptor met hoge affiniteit voor Fc ligand (Fc γ RI), en een 40 kDa receptor met lage affiniteit voor Fc ligand (Fc γ RII). De rol van beide receptoren bij de regulatie van secretie van TNF door monocyten wordt beschreven in hoofdstuk 5. Op onbehandelde monocyten leidt alleen cross-linking van Fc γ RI tot TNF-secretie. Echter, na behandeling van de monocyten met proteolytische enzymen of met het deglycosylerende enzym neuraminidase kan TNF-secretie ook door cross-linking van Fc γ RII worden geïnduceerd. Dit berust op een toename van de binding van Fc ligand aan Fc γ RII na behandeling van de monocyten met deze enzymen, waardoor effectievere cross-linking van Fc γ RII kan plaatsvinden. Tevens wordt aangetoond dat TNF-secretie alleen geïnduceerd kan worden middels Fc-Fc γ receptor interacties, maar niet wanneer cross-linking van Fc γ

receptoren door monoclonale anti-Fc γ receptor antilichamen plaatsvindt. Deze antilichamen binden met het F(ab')₂ deel aan verschillende epitopen van Fc γ receptoren, waarbij cross-linking van Fc γ receptoren plaatsvindt zonder dat TNF secretie wordt geïnduceerd. Deze bevindingen suggereren dat Fc γ RII fungeert als een 'stand-by' receptor, die onder invloed van proteases en neuraminidase, vrijkomend in ontstekingsgebieden, functioneel wordt ten aanzien van de inductie van TNF secretie.

In hoofdstuk 6 wordt het effect bestudeerd van twee verschillende corticosteroiden, prednisolon en budesonide, op de secretie van TNF door monocyten, geïnduceerd door verschillende stimulerende agentia. Beide corticosteroiden remmen dosis-afhankelijk TNF secretie, maar de mate van remming is afhankelijk van het stimulerend agens. Sterke remming treedt op wanneer TNF secretie wordt geïnduceerd door LPS of na cross-linking van Fc γ receptoren. Slechts geringe remming wordt gezien na inductie van TNF secretie door het proteïne kinase C-activerende agens PMA. Intermediaire remming treedt op na inductie van TNF secretie door silica quartz. Tevens wordt aangetoond dat remming van TNF secretie door beide corticosteroiden snel reversibel is. De aanwezigheid van corticosteroiden tijdens de fase van celactivatie is noodzakelijk voor optimale remming van TNF secretie. Deze bevindingen verklaren een van de mechanismen van het immunosuppressieve en anti-inflammatoire effect van corticosteroiden *in vivo*. TNF wordt beschouwd als een cruciale endogene mediator betrokken bij de pathogenese van septische shock. Het sterk remmende effect van corticosteroiden op de door endotoxine geïnduceerde TNF secretie verklaart mogelijk ten dele de beschermende werking van corticosteroiden in experimentele sepsisstudies in proefdiermodellen. Daarnaast draagt remming van de door Fc γ receptoren geïnduceerde TNF secretie bij tot de therapeutische werkzaamheid van corticosteroiden bij immunocomplexziekten zoals rheumatoïde arthritis, waarin TNF mogelijk een pathofysiologische rol speelt.

In hoofdstuk 7 wordt aangetoond dat behandeling van acute niertransplantaatrejectie met antithymocyten globuline (ATG) gepaard gaat met een verhoging van de plasma TNF spiegel. De bijwerkingen van deze therapie, zoals koorts, koude rillingen, misselijkheid, braken, dyspnoe e.a., treden op in de periode dat de plasma TNF spiegel verhoogd is. Toediening van de tweede dosis ATG aan de niertransplantatiepatiënten van onze studie gaat slechts met geringe bijwerkingen gepaard, en plasma TNF spiegels zijn dienovereenkomstig laag. Dit suggereert dat TNF, althans ten dele, verantwoordelijk is voor het ontstaan van deze bijwerkingen. Deze conclusie wordt gesteund door bevindingen uit fase I studies van recombinant TNF (rTNF) als antitumor middel in de mens. De bijwerkingen van toediening van rTNF aan mensen gelijken sterk op de bijwerkingen van toediening van anti-T cel antilichamen zoals ATG. *In vitro* experimenten tonen aan dat ATG de secretie van TNF door mononucleaire cellen induceert. Dit wordt niet veroorzaakt door activatie of lysis van T lymphocyten. Mogelijk wordt TNF in deze experimenten gesecreteerd door monocyten na opsonisatie van, met ATG gecoat, lymphocyten via een door Fc receptoren gemedieerd proces.

In hoofdstuk 8 wordt tenslotte aangetoond dat bij septische patiënten in een van de vier gevallen verhoogde TNF spiegels in het plasma aantoonbaar zijn. De mortaliteit van patiënten met aantoonbare plasma TNF spiegels blijkt significant hoger te zijn dan die van septische patiënten zonder aantoonbare TNF spiegels. Het verschil in morta-

liteit lijkt niet verklaard te kunnen worden door verschillen in ernst van de sepsis of ernst van het multi-orgaan falen (MOF), aangezien de parameters gebruikt om de ernst van sepsis of MOF te schatten, niet verschillen tussen beide groepen patiënten. Talrijke dierexperimentele studies bevatten aanwijzingen dat TNF een belangrijke pathogenetische betekenis heeft voor het ontstaan van shock en MOF tijdens sepsis. Twee klinische studies hebben een verband aangetoond tussen de aanwezigheid van circulerend TNF en mortaliteit bij patiënten met meningococcensepsis. Onze studie bevestigt deze bevindingen voor een populatie septische patiënten met een breed scala aan onderliggende ziektes.